Untersuchungen zur Frage der Elimination und des Abbauortes Rh-positiver Erythrozyten durch Anti-D

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

Angelika Kasik-Dennhardt

aus Jülich

Bonn 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0033

Untersuchungen zur Frage der Elimination und des Abbauortes Rh-positiver Erythrozyten durch Anti-D

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

Vorgelegt von

Angelika Kasik-Dennhardt

aus Jülich

Bonn 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Schneider

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. B. Hünermann

Aus der Abteilung für Immunologie
(Prof. Dr. J. Schneider) an der Frauenklinik
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn (Prof. Dr. E. J. Plotz)

Druck: Fotodruckerei J.Mainz, 51 Aachen, Neupforte 13

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Versuchspersonen	7
Serologische Methoden	11
Testprinzip	11
Bestimmung der Blutgruppe im ABO-System	12
Kreuzprobe	12
Serologische Untersuchungen im Rhesus-System	12
Antikörpersuchteste	13
Nuklearmedizinische Methoden	17
1. Leber-Milz-Szintigraphie	17
2. Chrom-Markierung Rh-positiver Erythrozyten	17
3. Organ-Messung	18
4. Radioaktivitätsmessung im Blut	19
5. Berechnung der Halbwertszeiten	19
6. Berechnung der Überschußimpulse	2o
7. Versuchspräparate	21
Statistik	22
Ergebnisse	23
Diskussion	5o
Zusammenfassung	55
Literaturverzeichnis	57

Einleitung

Der Wirkungsmechanismus der Immunglobulin-anti-D-Behandlung (IgG-anti-D-Prophylaxe) zur Prophylaxe des Morbus haemolyticus neonatorum ist bis heute immer noch nicht völlig geklärt. Nach den Ausführungen von Weitzel (1975) haben weder Modellversuche an in vitro-Systemen noch tierexperimentelle Studien zu einer endgültigen Aufdeckung des Wirkungsmechanismus der Rh-Prophylaxe geführt. Das mag zum Teil daran liegen, daß bis heute das Rh-Antigen nicht endgültig rein dargestellt werden konnte und andererseits Sensibilisierungsversuche am Menschen mit dem Ziel, Studien zum Wirkungsmechanismus zu betreiben, das Risiko einer Rhesus-Sensibilisierung beinhalten. Wir haben auf ein in der Nuklearmedizin bekanntes Verfahren zurückgreifen können, um Einzelfragen zur Wirkung von Anti-D am Menschen zu untersuchen.

Durch Versuche an Rh-negativen Probanden sollten folgende Fragestellungen einer Lösung näher gebracht werden:

1.) Gibt es wesentliche Unterschiede nach intramuskulärer oder intravenöser Anwendung von IgG-anti-D?

2.) Lassen sich unterschiedliche Wirkungen erkennen, wenn verschiedenartig hergestellte Präparate Anwendung finden?

3.) Ist eine Prophylaxe auch bei Personen mit der Untergruppe D^u möglich?

4.) Wie ist das Einzelergebnis bei einer splenektomierten Versuchsperson in den derzeit diskutierten Wirkungsmechanismus einzuordnen?

Bei den vorliegenden Versuchen wurde die Berechnung der Halbwertszeiten von Rh-positiven Erythrozyten in Rh-negativen freiwilligen Versuchspersonen nach Anwendung von IgG-anti-D durch Injektion radioaktiv markierter Erythrozyten möglich. Gleichzeitig konnte der hauptsächliche Abbauort der injizierten Erythrozyten nach IgG-anti-D-Behandlung ermittelt werden.

Die Anwendung der radioaktiven Markierung von Erythrozyten mit ^{51}Cr wurde 1950 von Gray und Sterling methodisch erarbeitet. Inzwischen haben mehrere Autoren mit Hilfe dieser Methode Immunisierungsversuche an Freiwilligen zur Gewinnung von Anti-D-Seren durchgeführt (Adner et al., 1963; Cook, 1971; Gibson, 1973).

In der Hämatologie wurde die Methode zur Untersuchung der Elimination von ABO-inkompatiblen Erythrozyten (Adner und Sjölin, 1957; Mollison und Huhges-Jones, 1958; Hughes-Jones et al., 1957; Sieg et al., 1970) und zur Ermittlung des Sequestrationsortes bei hämatologischen Erkrankungen (Jandl und Greenberg, 1957; Read et al., 1954) eingesetzt. Klinisch wird mit Hilfe der ^{51}Cr-Markierungen die Berechnung des Blutvolumens (Read, 1954; Sterling und Gray, 1950) routinemäßig durchgeführt. Einzelergebnisse über die Elimination von ^{51}Cr-markierten Rh-positiven Erythrozyten bei Rh-negativen Personen nach i.v.-Anwendung von IgG-Anti-D und auch nach i.m.-Anwendung liegen bereits vor (Börner, 1969; Börner et al., 1969; Leidenberger, 1967; Schneider et al., 1970).

Versuchspersonen

In der vorliegenden Arbeit wurden die auswertbaren Ergebnisse an 26 freiwilligen Versuchspersonen gewonnen. Das Durchschnittsalter betrug 46 Jahre. Die jüngste Versuchsperson war 28 Jahre alt und die älteste 72 Jahre. In einem Fall handelte es sich um einen 42-jährigen Mann.

Bei den Frauen handelte es sich um Probandinnen, die aufgrund vorausgegangener Operationen oder aus anderen Gründen keine Schwangerschaft mehr zu erwarten hatten. Alle Probanden wurden über die Art der Experimente und eventuelle Nebenwirkungen aufgeklärt und nur dann in den Versuch aufgenommen, wenn diese sich freiwillig einverstanden erklärten. Die Protokolle zu jedem Versuch sind im Archiv der Universitäts-Frauenklinik einsehbar. Die wichtigsten Daten der Versuchspersonen einschließlich der Blutgruppenformel sind in Tabelle 1 bis 3 (Seite 8-10) zusammengestellt. Alle Probanden waren nach serologischen Kriterien nicht sensibilisiert.

Tabelle 1

Proband	Alter	Klinische Diagnose	Blutgruppen Rh-Faktoren
1	49	Polyposis uteri	B ccddee
2	52	Blutungen in der Postmenopause	O ccddee
3	39	Dekompensierende Pulmonalstenose; Tubenligatur	O ccddee
4	43	Descensus uteri et vaginae	A ccddee
5	38	Endometriosis genitalis externa et interna	AB ccddee
6	44	Descensus uteri et vaginae	B ccddee

Versuchspersonen geordnet nach Behandlungsgruppen.
Alle Probanden wurden mit 300 mcg Anti-D intravenös behandelt.

Tabelle 2

Proband	Alter	Klinische Diagnose	Blutgruppen Rh-Faktoren
7	36	Tuboovarialzysten	B ccddee
8	43	Myomata uteri	0 ccddee
9	62	Descensus uteri et vaginae	0 ccddee
10	35	Multiparität; Tubenligatur	0 ccddee
11	56	Neoplasma colli uteri IIb	A ccddee
12	43	Myomata uteri	0 ccddee
13	44	Myomata uteri	0 ccddee
14	43	Descensus uteri vaginae	0 ccddee
15	35	Zystovar bei Myohyperplasia uteri	0 ccddee

Versuchspersonen geordnet nach Behandlungsgruppen.
Alle Probanden wurden mit 300 mcg Anti-D intramuskulär behandelt.

Tabelle 3

Proband	Alter	Klinische Diagnose	Blutgruppen Rh-Faktoren
16	59	Rezidivzystocele bei Zustand nach vag.Hysterekt.	O ccddee
17	32	Descensus uteri vaginae	O ccddee
18	46	Myomata uteri	O ccddee
19	39	Myomata uteri	A ccD^uEe
2o	46	Myomata uteri	B ccD^uEe
21	47	Portale Hypertension bei Lebercirrhose; Zustand nach Splenektomie	A ccddee
22	47	Neoplasma colli uteri, Stadium III	B ccddee
23	72	Neoplasma colli uteri, Stadium IIb	O ccddee

Versuchspersonen geordnet nach Behandlungsgruppen.
Proband 16-18 = intravenöse Behandlung mit 300 mcg Anti-D-Gammavenin (Op 141071)
Proband 19-20 = intravenöse Behandlung mit 300 mcg Anti-D bei D^u-positiven Probanden
Proband 21 = intravenöse Behandlung mit 300 mcg Anti-D bei einem splenektomierten Proband.
Proband 22-23 = Kontrollpersonen ohne Anti-D-Behandlung.

Serologische Methoden

Die serologischen Methoden sind als allgemeine Routinemethoden bekannt. Eine Beschreibung erfolgt deshalb nur insoweit, als diese zum Vergleich erforderlich ist.

Testprinzip:
Zur Identifizierung von Blutgruppenantigenen oder zirkulierenden Antikörpern gegen Blutgruppenantigene müssen die jeweiligen spezifischen Antikörper (Blutgruppentestseren) oder die jeweiligen erythrozytären Antigene (Blutgruppen und Faktoren) bekannt sein. Um die Blutgruppe oder Faktoren zu bestimmen, benötigt man ein Antiserum mit bekannten Antikörperspezifitäten. Umgekehrt lassen sich mit Testerythrozyten mit bekannten Antigendeterminanten Antikörper unbekannter Spezifität identifizieren.

Die Reaktion zwischen Erythrozyten und Antikörpern wird als Agglutination sichtbar. Bei nicht agglutinierenden Antikörpern kann durch Reaktion mit dem Antigen-Antikörperkomplex (= Erythrozyt und korrespondierender Antikörper) eine Agglutination dadurch erreicht werden, daß man in der Coombs-Technik einen agglutinierenden Antikörper, dessen Spezifität sich gegen den Blutgruppenantikörper richtet, anwendet (Coombs, 1951).
Alle hier im weiteren aufgeführten Techniken sind gemäß der Richtlinien der Bundesärztekammer (1968) in modifizierter Form nach der von Müller-Eckerhardt angegebenen Methode ausgeführt worden.

Bestimmung der Blutgruppe im ABO-System

Die Bestimmung der ABO-Blutgruppen erfolgte als Objektträger-Methode mit käuflichen Testseren der Firma Dade (CH 3018 Bern). Als Negativkontrolle wurde jeweils Serum der Versuchsperson mitgeführt.

Kreuzprobe

Zur Prüfung der Verträglichkeit zwischen O Rh-positiven Erythrozyten und den Empfängerseren wurde Empfängerserum gegen Spendererythrozyten getestet.
In einem Gegentest wurden zusätzlich Spenderserum gegen Empfängererythrozyten getestet und in einem III-Stufen-Coombs-Test auf Agglutination überprüft.

Serologische Untersuchungen im Rhesus-System

1.) Bestimmung des D-(Rh_o)-Faktors

Die Bestimmung des D-Faktors erfolgt wie alle weiteren Bestimmungen ebenfalls mit käuflichen Testseren der Firma Dade (CH-3018 Bern).
Mit inkompletten Anti-D-Testseren wurde die Objektträger- und Röhrchenmethode angewendet.

2.) Bestimmung der Rhesus-Faktoren

Die Bestimmung der Rh-Faktoren C, $\bar{c}$, E und e erfolgte ebenfalls mit inkompletten Testseren als Objektträger- und Röhrchenmethode.

Antikörpersuchteste

Als Antikörpersuchtest wurde der in serologischen Laboratorien gebräuchliche NaCl-Test, als Fermenttest der Bromelasetest, sowie der Albumin-Coombs-Test an käuflichen Testerythrozyten (Search-Cyte I und Search Cyte II) Firma Merz und Dade (CH 3018 Bern) durchgeführt. Dadurch wurde ein weitgehender Ausschluß einer bereits bestehenden Sensibilisierung möglich. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Es wurden von jedem Serum, das getestet werden sollte, in zwei Reagenzgläser I und II je 2 Tropfen mit einer Meßpipette vorgelegt. Search-Cyte-Zellen wurden durch leichtes Schütteln unmittelbar vor dem Gebrauch resuspendiert. In Reagenzglas I wurde ein Tropfen von Search-Cyte I gegeben, in Reagenzglas II von Search-Cyte II und durch Schütteln gleichmäßig verteilt.
2. Die Suspensionen wurden sofort zentrifugiert. Danach wurde das Sediment unter vorsichtigem Hin- und Herbewegen auf Agglutination geprüft.
3. Nach dem Ablesen wurden in jedes Reagenzglas 3 Tropfen von 30 %igem Rinderalbumin hinzugegeben und mit dem Inhalt des Reagenzglases vermischt. Danach wurde erneut zentrifugiert und auf Agglutination geprüft.
4. Die Reagenzgläser wurden 30 min bei 37°C inkubiert, danach zentrifugiert und dann nochmals auf Agglutinate geprüft.
5. Die Suspensionen wurden 3-mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und einem Coombs-Serum vom Kaninchen zugegeben (Firma: Merz und Dade).

Als positives Ergebnis wurde bewertet, wenn in einem oder in beiden Reagenzgläsern bei einer oder mehreren Ablesungen Agglutinationen zu sehen waren. Darüber hinaus kann die Agglutination auch durch irreguläre oder atypische Isoantikörper verursacht werden. Schließlich können derartige Reaktionen aber auch positiv werden, wenn das Serum unspezifische Autoagglutinine enthält.
Zur Bewertung eines positiven Ergebnisses ist deshalb eine Kontrolle notwendig. Diese besteht darin, daß die Punkte 1-5 zu wiederholen sind und gleichzeitig ein drittes Reagenzglas mitzutesten ist, welches eine 3%ige gewaschene Erythrozyten-Lösung des Spenders und das Serum des Spenders enthält. Wenn dieses Kontrollreagenzglas ebenfalls Agglutinationen zeigt, liegen Autoagglutinine vor. Wenn die Kontrolle dagegen negativ ist, müssen die Antikörper als spezifische Rh-Antikörper angesehen werden.

Vor Versuchsbeginn wurde durch eine Drei-Stufen-Kreuzprobe zwischen Spender und Empfänger die Kompatibilität gesichert. Wir gingen dabei folgendermaßen vor:

Stufe I : In zwei Reagenzgläser wurden je 2 Tropfen Empfängerserum und 3 Tropfen 30 %iges Albumin gegeben. In das Teströhrchen wurde 1 Tropfen Erythrozytensuspension vom Spender, in das Kontrollröhrchen 1 Tropfen Erythrozytensuspension vom Empfänger pipettiert. Beide Röhrchen wurden gut gemischt und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1500 U-Min. 2 Minuten zentri-

fugiert und auf der Rhesusschaukel aufgeschüttelt und auf Agglutination geprüft.

Stufe II: Die Röhrchen wurden 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert, danach eine Minute bei 1500 U/Min zentrifugiert und auf Agglutination geprüft.

Stufe III: Der Inhalt der beiden Röhrchen wurde 3-mal mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen. Dazu wurden die Röhrchen mit Hilfe einer Spritzflasche bis zur Hälfte mit NaCl gefüllt, wobei das ganze Sediment gleichmäßig aufgeschwemmt wurde. Danach wurden die Röhrchen eine Minute bei 1500 U/Min. zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen, das Sediment aufgeschüttelt und der Waschvorgang noch 2-mal wiederholt. Nach dem 3. Waschvorgang wurde die NaCl-Lösung vollständig entfernt und in beide Röhrchen 1 Tropfen Coombs-Serum gegeben. Die Röhrchen wurden nochmals eine Minute bei 1000 U/Min zentrifugiert, danach über der Rhesusschaukel aufgeschüttelt und auf Agglutination geprüft.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Testes haben wir nach Bromelasebehandlung die Kontrolle wiederholt. Dazu wurden in zwei Reagenzgläser je 2 Tropfen Empfängerserum gegeben. In das Teströhrchen wurde 1 Tropfen Erythrozytensuspension vom Spender zugegeben, in das Kontrollröhrchen 1 Tropfen Erythrozytensuspension vom Empfänger. Danach läßt man die Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Beide Röhr-

chen wurden eine Minute bei 1500 U/Min zentrifugiert. Die Röhrchen wurden über der Rhesusschaukel sorgfältig aufgeschüttelt und auf Agglutination geprüft. Danach wurde in jedes Röhrchen ein Tropfen Bromelase zugegeben, gut gemischt und die Röhrchen bei Raumtemperatur 15 Minuten stehengelassen. Beide Röhrchen wurden dann bei 1000 U/Min eine Minute lang zentrifugiert, erneut aufgeschüttelt und auf Agglutinationen geprüft.

Antikörperdifferenzierung und Antikörpertitration

Die Antikörperdifferenzierung erfolgte an Testzellen mit 11 bekannten Antigenen. Für die Antikörperdifferenzierung wurde der NaCl-, Ferment- und Albumin-Coombs-Test durchgeführt. Die Antikörpertitration wird entweder nach Herstellung einer Verdünnungsreihe in physiologischer Kochsalzlösung (0,1 ml NaCl-Lsg. + 0,1 ml Serum) oder in 22 %igem Albumin als ein Albumin-Coombs-Test mit jeder Verdünnungsstufe vorgenommen. Als Endpunkt der Titration gilt die Verdünnungsstufe, bei der eine Agglutination noch deutlich erkennbar ist.

Nuklearmedizinische Methoden

Alle nuklearmedizinischen Untersuchungen wurden im Institut für Klinische und Experimentelle Nuklearmedizin der Universität Bonn (Direktor: o.Prof.Dr.C.Winkler) unter Anleitung durch Herrn PD. Dr. Hünermann durchgeführt.

1. Leber-Milz-Szintigraphie

Um eine genaue und reproduzierbare Positionierung der bei späteren Messungen verwendeten Szintillationssonden zu ermöglichen, wurden 24 Stunden vor dem eigentlichen Versuch von jeder Versuchsperson nach der von Winkler angegebenen Technik mit ^{99m}Te-Sulfurkolloid ein Leber- und Milzszintigramm angefertigt. Dabei wurden die Speicherungsmaxima über Leber und Milz auf der Haut mit Fettstiften markiert.

2. Markierung Rh-positiver Erythrozyten mit ^{51}Cr

Die Methodik wurde in Anlehnung an Emrich (1971) eingesetzt. Es wurden jeweils gewaschene Rh-positive Erythrozyten des gleichen Blutspenders mit der Blutgruppe O Rh positiv (CcDee) für alle Versuche verwendet. Für jeden Versuch wurde in einer 20 ml-Plastikspritze, in welcher 4 ml ACD vorgelegt waren, unter streng aseptischen Bedingungen 10 ml Venenblut entnommen. Die Markierung wurde nach den Angaben von Gray et al. mit radioaktivem Natriumchromat ($Na_2Cr^{51}O_4$) in leicht modifizierter Form vorgenommen. Die Blutproben wurden nach Zugabe von 300 uC^{51}Cr und nach sorgfältiger Durchmischung bei 21 - 23°C 20 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozy-

ten in einer Zentrifuge (Hebellänge 20 cm) bei 3000 U/Min. (entsprechend 150 g) 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Weitere Waschungen der Erythrozyten wurden nach Resuspendierung in physiologischer, ungepufferter Kochsalzlösung unter den gleichen Bedingungen wiederholt, und zwar so lange, bis im Überstand keine wesentliche Radioaktivität mehr nachweisbar war. In der Regel waren nach dreimaligem Waschen keine wesentlichen Impulse im Überstand mehr vorhanden.
Nach Beendigung der Chromierung resultierten etwa 3-4 ml Sediment. Das Sediment wurde auf das Ausgangsvolumen von 10 ml mit physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgefüllt und nach sorgfältiger Resuspendierung langsam (innerhalb 2 bis 3 Minuten) den Versuchspersonen injiziert. Die Verträglichkeit der Erythrozyten wurde vor jedem Versuch durch eine Kreuzprobe gesichert.

3. Organ-Messung

Frühstens 24 Stunden nach dem Leber-Milz-Szintigramm wurden die Versuche weitergeführt. Die Impulse, die vor jedem Versuch bei einer O-Effekt-Messung ermittelt wurden, wurden bei allen weiteren Messungen abgezogen. Eine Ausgangsmessung erfolgte 30 Minuten nach Injektion der markierten Erythrozyten. Weitere 30 Minuten später wurden jeweils 300 µg Anti-D appliziert. Die anschließenden Messungen wurden nach intravenöser Anti-D-Injektion nach einer nochmaligen Pause von 30 Minuten und von 6 Stunden nach intramuskulärer Anti-D-Injektion erforderlich. Aufgrund der 0,32 MeV-Gamma-

Strahlung des ^{51}Cr kann mittels eines Szintillationszählers die Strahlung über den beschriebenen Organen gemessen werden. Die Messungen wurden an einem Zweikanalfunktionsstand mit Zylinderkollimatorsonde von 9 cm Achsenlänge und 4 cm Öffnung ausgeführt. Gleiche Meßgeometrie bei allen nachfolgenden Messungen wurde weitgehend dadurch erreicht, daß bei der ersten Messung die Position der Meßsonden nochmals auf der Haut markiert wurde. Als Meßort für das Herz wurde regelmäßig der vierte Interkostalraum parasternal links gewählt. Die Meßzeit betrug mindestens eine Minute, bei niedrigen Impulszahlen entsprechend länger.

4. Radioaktivitätsmessung im Blut

Nach Versuchsabschluß wurden alle Blutproben gleichzeitig gemessen, wodurch der Aktivitätsabfall durch die physikalische Halbwertszeit des ^{51}Cr von 27,5 Tagen unberücksichtigt bleiben konnte. Aus 2 ml Proben, die jeweils in heparinisierten Plastikspritzen entnommen worden waren, wurde nach guter Durchmischung ein Milliliter entnommen und durch Nachspülen der Pipette mit 1 ml Wasser eine Hämolyse herbeigeführt. Die Messung erfolgte in einem Gamma-Probenwechsler der Firma Packard (Modell 5120).

5. Berechnung der Halbwertszeiten

Die Meßwerte der Blutproben wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, wodurch graphisch die Halbwertszeit ermittelt werden konnte.

6. Berechnung der Überschußimpulse

Die Überschußimpulse in Leber oder Milz gelten als Indikator für die Sequestration injizierter und radioaktiv markierter Erythrozyten in diesen Organen (Emrich, 1971; Hughes-Jones und Szur, 1957). Die anfängliche Impulsrate über dem Herzen wird gleich 1000 gesetzt und alle weiteren Impulsraten auf diesen relativen Ausgangswert bezogen. Das ist durch Multiplikation mit $\frac{1000}{N_{to\ Herz}}$ möglich. $N_{to\ Herz}$ ist gleich der anfänglichen Impulsrate über dem Herzen. Die Überschußimpulsraten in Leber und Milz ergeben sich aus der Differenz der zum Zeitpunkt gemessenen (korrigierten) und aufgrund des kardialen Abfalles erwarteten Impulsrate.

Formelmäßig

$$U = N_t \times F - N_{to} \times F \times \frac{N_{t\ Herz}}{N_{to\ Herz}}$$

dabei gilt

N_{to} = initiale Impulsrate über den Organen

N_t = augenblickliche Impulsrate über den Organen

$F = \frac{1000}{N_{to\ Herz}}$

U = Überschußimpulse

Die Normalwerte für die Milz betragen bis 300 und für die Leber bis 150 Überschußimpulse.

7. Versuchspräparate

Es wurden jeweils 300 µg eines Präparates intravenös oder intramuskulär injiziert. Alle Präparate sind im Handel erhältlich und nach den Vorschriften der WHO 1971 hergestellt. Die Bestimmung des Anti-D-Gehaltes wurde im Auf-

trag der Herstellerfirmen durch Hughes-Jones in London radioimmunologisch durchgeführt.

Es wurden 4 verschiedene Präparate verwendet:

1. Anti-D Hersteller: Zentralinstitut für das Bluttransfusionswesen in Hamburg, Charge: 92, Herstellungsverfahren: Chromatographie an Sephadex.

2. Anti-Rh 300 Hersteller: Biotest-Seruminstitut, Charge: 10/221, Herstellungsverfahren: modifiziertes Plasmapräparat, hergestellt durch Kombinationsbehandlung mit ß-Propiolacton und U.V. Bestrahlung (Stephan 1971)

3. Anti-D-Gammavenin Hersteller: Behringwerke, Charge: 141071, Herstellungsverfahren: Ammoniumsulfatfällung und Pepsinbehandlung. Bei diesem Präparat handelt es sich um ein Versuchspräparat, welches nicht im Handel ist.

4. Rhesogam Hersteller: Behringwerke, Herstellungsverfahren: Ammoniumsulfatfällung, keine Pepsinbehandlung. Die Firma empfiehlt, dieses Präparat nur intramuskulär zu injizieren.

Statistik

Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde der

U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY

nach den Angaben von SACHS (1971) durchgeführt, wobei ein verteilungsfreies Verfahren für den Vergleich zweier Stichproben zur Anwendung kam.

Der U-Test prüft die Nullhypothese, daß zwei unabhängige Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen; d.h. $u_1 = u_2$. Zur Berechnung der Prüfgröße U werden die m + n Stichprobenwerte in eine gemeinsame Rangfolge gebracht und bei jeder Rangzahl vermerkt, aus welcher der beiden zu vergleichenden Stichproben diese stammt. Die Summe der aus Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen sei R_1, die Summe der aus Stichprobe 2 entfallenden Rangzahlen sei R_2. Die Berechnung der Prüfgrößen U_1 und U_2 ergibt sich aus:

$$U_1 = mn + \frac{m\,(\,m + 1\,)}{2} - R_1$$

$$U_2 = mn + \frac{n\,(\,n + 1\,)}{2} - R_2$$

Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden Größen U_1 und U_2. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der berechnete Wert gleich oder kleiner dem kritischen Wert U (m, n) aus Tabelle 63 (Sachs 1971, Seite 232) ist. Approximativ kann auch nach $\hat{z}$ geprüft werden.

$$\hat{z} = \frac{U - \frac{mn}{2}}{\sqrt{\frac{mn\,(\,m + n + 1\,)}{12}}}$$

Die Nullhypothese wird auf dem 5%-Niveau verworfen, wenn

$\hat{z} = 1{,}96$ bei zweiseitiger Fragestellung ist.

Ergebnisse

Bei keiner Versuchsperson wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen Nebenwirkungen beobachtet. Weder nach Injektion der ^{51}Cr-markierten Erythrozyten noch nach Applikation der unterschiedlichen Immunglobulinpräparate waren allergische Reaktionen oder Schocksymptome feststellbar. In bezug auf die Anti-D-Präparate ist eine gute Verträglichkeit auch seit langem bekannt (Deicher et al. 1969).

Die Immuneliminationsstudien wurden bei Anwendung unterschiedlich hergestellter Präparate mit jeweils der gleichen Dosis von 300 µg IgG-anti-D durchgeführt. Die Bestimmung des Anti-D-Gehaltes in den hier verwendeten Präparaten wurde von Dr. Hughes-Jones in London nach einer von ihm entwickelten radioimmunologischen Methode durchgeführt (Hughes-Jones, 1967).

In einer ersten Versuchsreihe erhielten 6 Versuchspersonen jeweils 300 µg Anti-D 30 Minuten nach der Erythrozyteninjektion ausschließlich intravenös injiziert. Die dabei erhaltenen Meßdaten sind in Tabelle 4 bis 26 umgerechnet in Überschußimpulse von Leber und Milz sowie als Leber-Herz-Quotient, Milz-Herz-Quotient und Milz-Leber-Quotient angegeben.

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 1	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	39	45	1.12	1.11	o.99
II Messung	312	36	1.12	2.18	1.94
III Messung	7o9	24	1.1o	4.39	3.96
IV Messung	781	24	1.14	5.9o	5.15

Tabelle 4

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 2	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	41	o	o.99	1.12	1.12
II Messung	1211	28	o.92	4.99	5.4o
III Messung	1747	134	o.64	6.82	1o.63
IV Messung	2161	148	o.54	9.24	16.82

Tabelle 5

Proband 3	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	79	23	1.o4	1.o9	1.o4
II Messung	3199	52	1.27	11.11	8.7o
III Messung	4875	1o8	2.22	34.27	15.41

Tabelle 6

Proband 4	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	864	68	o.9o	1.95	2.14
II Messung	5225	24	o.92	14.53	15.69
III Messung	5539	3	1.o1	21.53	21.25
IV Messung	54o7	34	1.16	23.36	2o.oo

Tabelle 7

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 5	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	132	1o	1.o2	1.23	1.2o
II Messung	1262	11	o.95	4.16	4.35
III Messung	2217	21	1.1o	8.9o	8.o3

Tabelle 8

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 6	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	196	56	o.87	1.29	1.48
II Messung	1455	57	o.79	4.69	5.9o
III Messung	1921	17	o.89	9.4o	1o.54

Tabelle 9

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 7	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	129	245	o.63	1.24	1.95
II Messung	438	223	o.63	1.92	3.o2
III Messung	498	188	o.68	2.o8	3.o4

Tabelle 1o

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 8	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	88	1o2	1.33	1.21	o.91
II Messung	594	23	1.o8	2.59	2.39
III Messung	241o	132	2.2o	17.81	8.o7

Tabelle 11

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 9	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	178	49	1.18	1.9o	1.6o
II Messung	377	36	1.23	4.32	3.49
III Messung	945	1o5	4.32	41.55	9.61

Tabelle 12

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 1o	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	156	182	o.74	o.84	1.12
II Messung	2	282	o.63	o.99	1.58
III Messung	926	24	o.88	4.28	4.85

Tabelle 13

	ÜBERSCHUSSIMPULE		QUOTIENTEN		
Proband 11	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	94	58	o.89	o.8o	o.89
II Messung	83	125	o.79	o.83	1.o4
III Messung	2141	113	1.64	15.9o	9.64
IV Messung	2639	56	1.35	21.11	15.55

Tabelle 14

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 12	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	16o	21	o.96	1.43	1.49
II Messung	533	89	1.18	2.68	2.27
III Messung	965	85	1.18	4.23	3.57
IV Messung	3o19	77	1.22	14.84	12.o9

Tabelle 15

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 13	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	226	235	1.49	2.o1	1.35
II Messung	1185	315	2.39	12.31	5.13
III Messung	1469	219	2.47	22.33	9.oo

Tabelle 16

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 14	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	17o	58	o.42	o.67	1.57
II Messung	16o	56	o.4o	1.32	3.28
III Messung	533	23	o.62	2.63	4.2o
IV Messung	173o	24	o.5o	7.84	15.44

Tabelle 17

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 15	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	615	17	1.03	2.19	2.11
II Messung	2412	138	1.61	11.25	6.95
III Messung	2737	44	1.36	22.58	16.54

Tabelle 18

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 16	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	33	73	1.18	1.07	0.90
II Messung	39	55	1.14	0.90	0.79
III Messung	31	56	1.17	1.09	0.92
IV Messung	54	23	1.07	1.16	1.08
V Messung	10	51	1.19	0.96	0.80
VI Messung	41	72	1.28	1.15	0.89

Tabelle 19

Proband 17	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	16	19	o.95	1.o3	1.o7
II Messung	27	115	o.76	o.95	1.24
III Messung	44	41	o.9o	1.o8	1.2o
IV Messung	79	42	o.89	1.16	1.3o
V Messung	45	88	o.79	1.o8	1.37
VI Messung	23	56	o.86	o.95	1.1o
VII Messung	3	64	o.84	1.oo	1.18
VIII Messung	13o	7o	o.82	1.25	1.52
IX Messung	159	69	o.82	1.32	1.6o
X Messung	151	34	o.9o	1.34	1.48
XI Messung	174	8	1.o2	1.43	1.39
XII Messung	357	16	o.94	1.98	2.o9
XIII Messung	494	29	1.12	2.72	2.41

Tabelle 2o

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 18	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	12	51	o.89	o.98	1.o9
II Messung	98	12	o.96	1.22	1.27
III Messung	51	26	o.9o	1.13	1.25
IV Messung	115	8	1.o3	1.34	1.3o

Tabelle 21

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 19	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	84	17	o.96	1.26	1.oo
II Messung	1484	3	o.91	2.55	2.78
III Messung	1745	28	1.13	17.85	11.44

Tabelle 22

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 2o	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	56	8	1.o2	1.2o	1.17
II Messung	374	46	1.13	2.36	2.o9
III Messung	2o58	163	2.o7	18.o5	8.7o
IV Messung	2259	143	1.98	2o.66	1o.4o

Tabelle 23

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 21	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	o	15	o.95	1.95	2.o4
II Messung	o	27	o.92	1.9o	2.o5
III Messung	o	3	o.99	2.15	2.17
IV Messung	o	5	1.o2	2.48	2.44
V Messung	o	13	1.o5	2.65	2.52
VI Messung	o	226	2.52	4.69	1.86

Tabelle 24

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 22	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	7	4o	o.91	1.o2	1.11
II Messung	76	7	o.98	1.27	1.29
III Messung	57	98	o.77	1.2o	1.55
IV Messung	187	79	1.47	2.68	1.82
V Messung	193	85	1.72	3.49	2.o2

Tabelle 25

	ÜBERSCHUSSIMPULSE		QUOTIENTEN		
Proband 23	MILZ	LEBER	Q=L/H	Q=M/H	Q=M/L
I Messung	7	76	o.84	1.o2	1.21
II Messung	37	3o	o.92	1.13	1.21
III Messung	35	89	o.56	1.12	1.99
IV Messung	187	57	1.33	2.68	2.oo
V Messung	191	83	1.69	3.42	2.o2

Tabelle 26

Nach intravenöser Anwendung zweier unterschiedlich hergestellter Präparate lagen die Halbwertszeiten zwischen 0,8 und 5,3 Stunden (Tabelle 27). Anhand der hohen Überschußimpulse über der Milz ist eine Sequestration der injizierten Erythrozyten in der Milz belegbar. Betrachtet man die Einzelergebnisse getrennt nach Anwendung der Präparate 1 und 2, so ergibt sich für das Präparat 2 eine etwas schnellere Elimination mit Halbwertszeiten zwischen 0,8 bis 1,2 Stunden gegenüber dem Präparat 1 mit 1,2 bis 5,3 Stunden. Eine statistische Prüfung dieser Tendenz ist jedoch bei der kleinen Versuchszahl nicht möglich. Es müßte vielmehr an einer grösseren Beobachtungsreihe geprüft werden, ob dieser Trend gesichert werden kann.

Aus der Tabelle 4 bis 9 ist weiterhin feststellbar, daß in keinem einzigen Falle eine Sequestration in der Leber stattfand. In allen Fällen lagen die Überschußimpulse nämlich weit unter der kritischen Grenze von 150 Impulsen und entsprachen damit den Organquotienten, die keinen Erythrozytenabbau in der Leber anzeigten.

Im Gegensatz zu den Versuchen 1 bis 6 wurde bei den Probanden 7 bis 15 IgG-anti-D intramuskulär injiziert. Dabei kamen drei unterschiedlich hergestellte Präparate bei jeweils drei Versuchspersonen zur Anwendung. Es handelte sich um die Präparate 1, 2 und 4.

Aus Tabelle 28 ist ersichtlich, daß die Elimination der injizierten Rh-positiven Erythrozyten aus der Zirkulation der Rh-negativen Empfänger stark verzögert war.

Tabelle 27

Halbwertszeiten, Überschußimpulse und Antikörperbefunde bei intravenös behandelten Personen

Versuch	Präparat	t/2	Überschußimpulse[+] Leber	Milz	Antikörperkontrollen innerhalb von 6 Monaten
1	1	5,3 h	59	637	negativ
2	1	3,7 h	80	1995	negativ
3	1	1,2 h	0	1144	negativ
4	2	1,0 h	5	1404	negativ
5	2	1,2 h	12	1244	negativ
6	2	0,8 h	0	617	negativ

[+] Berechnung der Überschußimpulse zur Halbwertszeit

Tabelle 28

Halbwertszeiten, Überschußimpulse und Antikörperbefunde bei intramuskulär behandelten Personen

Versuch	Präparat	t/2	Überschußimpulse+ Leber	Milz	Antikörperkontrollen bis zu 6 Monaten
7	1	37 h	o	668	negativ
8	1	2o h	113	219	negativ
9	1	22,5 h	2o	443	negativ
1o	2	25,5 h	o	434	negativ
11	2	21 h	45	625	negativ
12	2	29 h	42	323	negativ
13	4	26 h	229	782	negativ
14	4	28,5 h	o	421	negativ
15	4	28 h	19	729	negativ

+ Berechnung der Überschußimpulse zur Halbwertszeit

Tabelle 29

Halbwertszeiten, Überschußimpulse und Antikörperbefunde bei intravenös behandelten Personen

Versuch	Präparat	t/2	Überschußimpulse+ Leber	Milz	Antikörperkontrollen innerhalb von 6 Monaten
16	3	15 T	5	1o1	Anti-D 1:8 n. 3 Monaten + Anti-C 1:4 n. 6 Monaten
17	3	11 T	68	398	negativ
18	3	1o,5 T	14	45	negativ

+ Berechnung der Überschußimpulse zur Halbwertszeit

Tabelle 3o

Halbwertszeiten, Überschußimpulse und Antikörperbefunde bei Versuchspersonen mit dem Faktor D^u

Versuch	Präparat	t/2	Überschußimpulse+ Leber	Milz	Antikörperkontrollen bis zu 6 Monaten
19	1	13 h	49	1848	negativ
2o	1	15 h	1o1	171o	negativ

Tabelle 31

Halbwertszeiten, Überschußimpulse und Antikörperkontrollen bei splenektomierten Versuchspersonen

Versuch	Präparat	t/2	Überschußimpulse+ Leber	Antikörperkontrollen bis zu 6 Monaten
21	1	14,5 T	45o	Anti-D 1:16 n. 3 Monaten

+ Berechnung der Überschußimpulse zur Halbwertszeit

Die Eliminationshalbwertszeiten wurden zwischen 20 und 37 Stunden errechnet. Diese Unterschiede sind signifikant. Nach Prüfung mit dem U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY wurde die Prüfhypothese, daß die Mittelwerte t/2 aus Tabelle 27 gleich den Mittelwerten t/2 aus Tabelle 28 gleich seien, verworfen, da $U_2 = 0 < 10 = U\ (9,6; \alpha = 0,05)$ ist. Damit wird die Alternativhypothese auf das 5%-Niveau angenommen. Nach $\hat{z} = 3,18 > 1,96 = z\ 0,05$ wird die Entscheidung bestätigt.

Die Unterschiede zwischen den Eliminationsgeschwindigkeiten nach Anwendung der Präparate 1, 2 und 4 wurden statistisch aus den oben genannten Gründen nicht geprüft.

Die Überschußimpulsberechnungen mit den Organquotienten sind für diese Versuchsgruppe wiederum in den Tabellen 10 bis 18 zusammengestellt. Lediglich bei Versuchsperson 13 ergaben sich signifikant hohe Überschußimpulse nicht nur über der Milz, sondern auch über der Leber. Es konnte nicht geklärt werden, warum diese Versuchsperson gleichzeitig in der Leber einen gewissen Erythrozytenabbau erkennen ließ, während bei allen anderen Versuchspersonen eine Sequestration ausschließlich in der Milz nachweisbar war.

Individuelle Verläufe haben wir in Abbildung 1 bis 5 aufgezeichnet, die die verschiedenartigen Kurvenverläufe nach intravenöser oder intramuskulärer IgG-anti-D-Anwendung charakterisieren.

In einer dritten Versuchsgruppe wurde ein Testpräparat (Präparat 3) bei drei Versuchspersonen intravenös einge-

setzt (Tabelle 29). Dieses Präparat ist durch Pepsinbehandlung so verändert, daß es nicht mehr die Plazentarschranke passieren kann. Über die Bedeutung eines derartigen Präparates für die klinische Anwendung wird später noch diskutiert werden.

Dieses Präparat, ein sog. $F(ab')_2$-anti-D, führte zu einer enormen Verzögerung der Eliminationsgeschwindigkeit der injizierten Erythrozyten. Die Halbwertszeiten lagen zwischen 10,5 bis 15 Tagen im Gegensatz zu wenigen Stunden nach intravenöser Anwendung eines intakten Gammaglobulins. Das heißt, die Applikation von $F(ab')_2$-anti-D erwirkte weniger als ca 1/100 der Wirkung, welche die in der Klinik gebräuchlichen Präparate erkennen lassen.

Statistisch sind die Unterschiede ebenfalls gesichert. Da $U_2 = 0 < 1 = U\ (6,3; \alpha = 0,05)$ ist, wird die Nullhypothese verworfen. Die gleiche Entscheidung ergab sich nach $\hat{z} = 2,33 > 1,96 = z\ 0,05$.

Außer im Versuch 17 waren keine Überschußimpulse in der Milz nachweisbar. In dieser Versuchsgruppe wurde eine Versuchsperson sensibilisiert. Drei Monate nach dem Versuch war nämlich ein Anti-D mit einem Titer von 1 : 8 nachweisbar und weitere 3 Monate ein zusätzlicher Anti-C-Titer von 1 : 4.

Auch zu diesen Versuchen finden sich die Überschußimpulsberechnungen sowie die Organquotienten in Tabelle 19 bis 21. Durch Zufall konnten wir zwei D^u-positive Probandinnen in die Versuche aufnehmen. Für die Rhesus-Prophylaxe bestehen nämlich unterschiedliche Meinungen, ob Frauen mit

der Rh-Variante D^u einer Prophylaxe unterzogen werden sollten.

Nach Anwendung des Präparates 1 waren die Eliminationszeiten in dieser Gruppe zwar verlangsamt (Tabelle 30), es ließen sich aber hohe Überschußimpulse über der Milz als Ausdruck des dort stattfindenden Erythrozytenabbaues feststellen. Die Halbwertszeiten betrugen 13 und 15 Stunden. Eine statistische Überprüfung war nicht möglich.

Die Meßdaten und Überschußimpulse dieser Gruppe sind in Tabelle 22 bis 23 aufgezeichnet. Eine zwölfmonatige Verlaufskontrolle hat keine nachweisbare Antikörperbildung erkennen lassen.

Obwohl das Experimentalmodell, wie wir es verwendet haben, als nuklearmedizinische Routineuntersuchung in der Hämatologie eingesetzt wird, haben wir zwei unbehandelte Kontrollversuche mitgeführt. Die Halbwertszeiten dieser Personen entsprachen einem normalen Erythrozytenabbau von 28 und 29 Tagen ohne nachweisbare Überschußimpulse über Leber oder Milz (Tabelle 25 und 26). Eine dieser Personen wurde mit einem Anti-D-Titer von 1 : 8 nach 3 Monaten sensibilisiert.

Da nach Anwendung von IgG-Anti-D der Abbau der Rh-inkompatiblen Erythrozyten stets in der Milz nachweisbar war, schien es interessant zu prüfen, inwieweit nach Entfernung der Milz eine Protektion möglich ist.

In Zusammenarbeit mit der Chirurgischen Universitätsklinik haben wir einen splenektomierten Probanden untersuchen können. Es handelte sich um die Versuchsperson 21, die

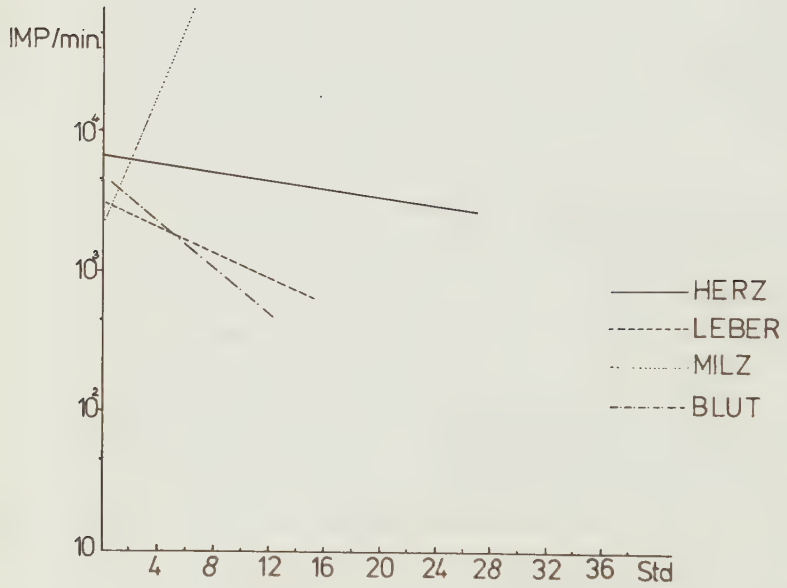

Abbildung: 1

Zeitaktivitätskurven nach intravenöser Injektion von 300 mcg IgG-anti-D. (Beispiel: Versuchsperson 2).

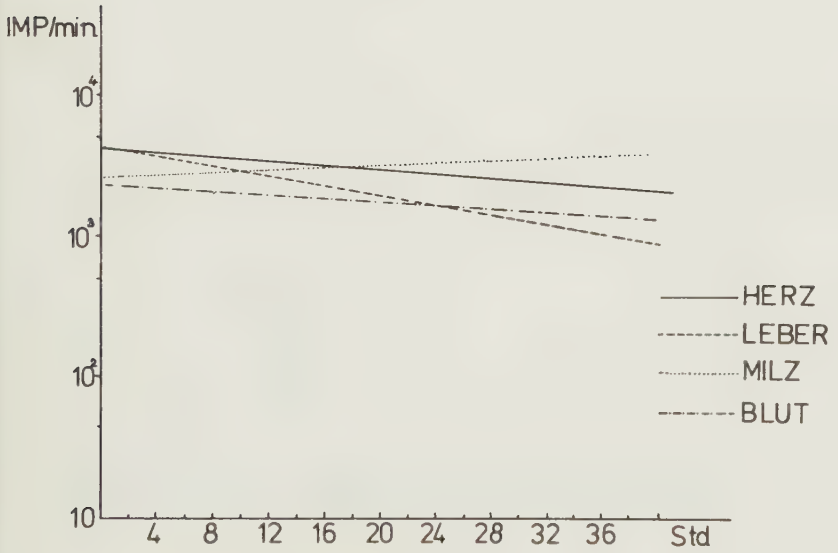

Abbildung: 2

Zeitaktivitätskurven nach intramuskulärer Injektion von 300 mcg IgG-anti-D. (Beispiel: Versuchsperson 7).

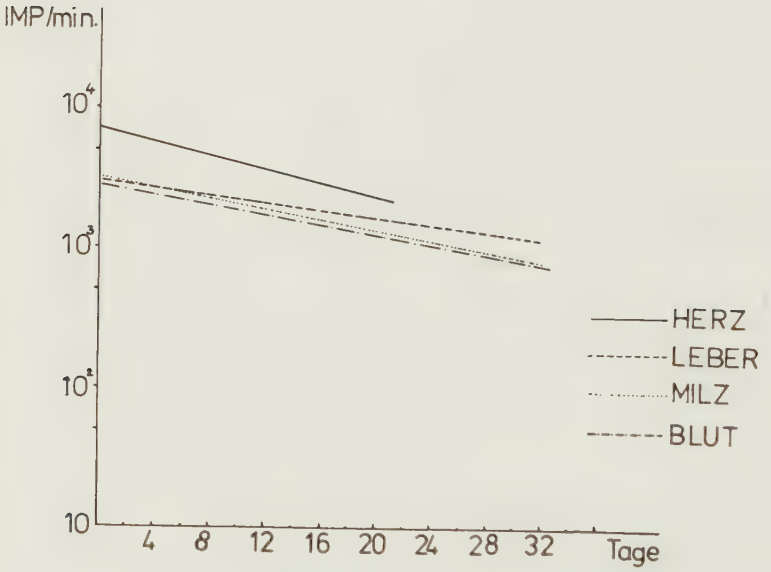

Abbildung: 3

Zeitaktivitätskurven nach intravenöser Injektion von 300 mcg $F(ab')_2$-anti-D (Charge 141071).
(Beispiel: Versuchsperson 16).

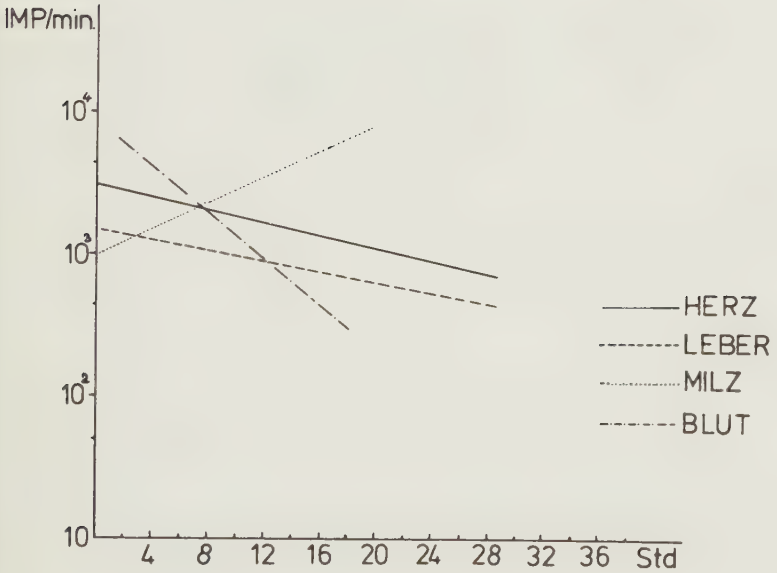

Abbildung: 4

Zeitaktivitätskurven nach intravenöser Injektion von 300 mcg IgG-anti-D bei einer D^u-positiven Versuchsperson. (Beispiel: Versuchsperson 19).

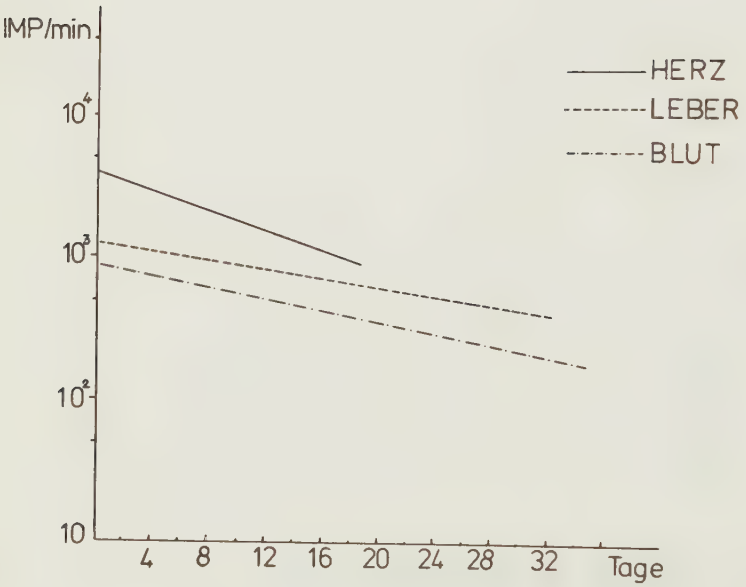

Abbildung: 5

Zeitaktivitätskurven nach intravenöser Injektion von 300 mcg IgG-anti-D bei einer splenektomierten Versuchsperson 21

wegen einer Lebercirrhose mit portaler Hypertension im Rahmen einer Shuntoperation splenektomiert wurde. Die Verlaufskurven dieser Person sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Überschußimpulsberechnung in Tabelle 24 und 31 läßt erkennen, daß eine minimale Sequestration der injizierten Erythrozyten in der Leber stattfand. Die Halbwertszeit errechnet sich mit 14,5 Tagen; die Immunelimination dauert also etwa 130 mal länger als nach intravenöser Anwendung des gleichen Präparates 1 bei nicht splenektomierten Patienten. Dieser Proband entwickelte ebenfalls nach 12 Wochen einen Anti-D-Titer von 1 : 16.

Diskussion

Der Einsatz ^{51}Cr-markierter Erythrozyten ist eine in der nuklearmedizinischen Diagnostik bewährte Methode (Emrich, 1971). Eliminationsstudien wurden sowohl an sensibilisierten Empfängern als auch nach in vitro-Inkubation mit Antikörpern beladenen Erythrozyten durchgeführt (Crome und Mollison, 1964; Cutbush und Mollison, 1958; Jandl, 1955, 1956 und 1960).

Die älteren Eliminationsuntersuchungen wurden jedoch vorzugsweise zur Klärung der Wirkung zirkulierender kompletter oder inkompletter, hämolysierender Antikörper durchgeführt (Jandl, 1957; Hughes-Jones, Mollison, 1962). Auch serologisch nicht nachweisbare Sensibilisierungen lassen sich durch eine beschleunigte Elimination ohne Zufuhr passiver Antikörper erkennen (Adner et al., 1963; Woodrow, Finn und Krevans, 1969).

Untersuchungen mit passiven D-Antikörpern sind zwar vereinzelt durchgeführt worden, systematische Untersuchungen stehen bisher jedoch noch aus (Börner et al., 1969; Börner 1969; Finn, Clarke, Donohoe et al., 1961; Leidenberger et al., 1967).

Obwohl die damaligen Ergebnisse in bezug auf die Wirkung von D-Antikörpern gleichartige Resultate erkennen ließen, war ein Vergleich der bisherigen Ergebnisse nicht möglich. Denn es wurden jeweils unterschiedliche Mengen von Erythrozyten und Antikörpern eingesetzt. Außerdem dürften die verwendeten Antikörper unterschiedliche Bindungskonstanten gehabt haben.

Die Eliminationsgeschwindigkeit ist aber auch von der Bindungskonstante der Antikörper abhängig (Mollison, Hughes-Jones, Lindsay und Wessely).

Unsere Ergebnisse nach intravenöser Anwendung lassen sich mit den Resultaten von Börner (1969) durchaus vergleichen. Schneider et al., (1970) konnten demgegenüber nach i.v.-Anwendung von Anti-D-Serum über extrem kurze Halbwertszeiten von 34 bis 36 Minuten berichten.

Die nach intramuskulärer Anwendung von IgG-anti-D beobachtete Verzögerung der Elimination war aus anderweitigen Versuchen bekannt (Schneider et al., 1970). Es ist daher erstaunlich, daß trotz oft verspäteter intramuskulärer Injektion von IgG-anti-D nach bis zu 72 Stunden post partum die Versagerrate nicht erhöht ist, wie die Zahlen der deutschen Rhesus-Studie der DFG belegen (Schneider et al., 1973).

Auch mit der Kleihauer-Betke-Methode konnte Bartsch (1972) vergleichbare Halbwertszeiten bestätigen. Mit Hilfe dieser Methoden lassen sich fetale HbF-haltige Erythrozyten selektiv darstellen und von erwachsenen HbA-haltigen Zellen unterscheiden. Dadurch wird eine Kontrolle eingeschwemmter oder injizierter fetaler, Rh-inkompatibler Erythrozyten möglich.

Das von uns untersuchte Versuchspräparat ist ein Antikörperfragment, welches als $F(ab')_2$-anti-D bezeichnet wird (Weitzel, 1975). Derartige Fragmente können die Plazentarschranke nicht überwinden (Kaplan, 1965; Mai, 1970; Weitzel, 1975). Diese sind deshalb für die Anwendung in der

Schwangerschaft interessant (Weitzel, 1975). Denn nach Untersuchungen von Bartsch et al., (1974) sind Einschwemmungen höchst immunogener fetaler Erythrozyten während der frühen Gravidität in einigen Fällen wahrscheinlich. Voraussetzung für den Einsatz derartiger Antikörperpräparate ist ihre biologische Wirksamkeit, die in unseren Experimenten nicht belegt werden konnte. Das mag teils an der kurzen biologischen Halbwertszeit von wenigen Stunden liegen (Bläker et al., 1972). Darüber hinaus beweisen Tierexperimente die Unwirksamkeit derartiger Antikörperfragmente schon seit langem (Sinclaire et al., 1970).

Inzwischen sind mit einer Charge dennoch kurze Eliminationszeiten erreicht worden (Deicher et al., 1970; Steenken et al., 1975; Weitzel, 1975).
Dennoch bleiben Zweifel an der Wirksamkeit bestehen (Weitzel, 1975).
Bei Untersuchungen an Probanden mit dem Faktor D^u gingen wir davon aus, daß diese durchaus Antikörper gegen alle anderen Rhesusfaktoren bilden können, also auch gegen D (Argall et al., 1953; Prokop und Uhlenbruck, 1966). Diese Sensibilisierungen können bei D^u-positiven Müttern zu schwerster Schädigung der Feten führen (Brandstädter, 1970). Die D^u-Faktoren weisen unterschiedliche "Antigenitätsgrade" auf, d.h. es gibt "starke" und "schwache" D^u-Blute (Luboldt, 1973). Diese Eigenschaft beruht darauf, daß der D^u-Faktor aus unterschiedlichen Partialantigenen des D-Faktors zusammengesetzt sein kann (Prokop und Uhlenbruck, 1966). Deshalb richten sich die in D^u-Personen entstehen-

den D-Antikörper nie gegen die eigenen D^u-Antigendeterminanten (Prokop und Uhlenbruck, 1966).

Unsere Probanden hatten ein starkes D^u (Weitzel, 1975). Wir müssen annehmen, daß nach Injektion von D-Antikörpern zunächst eine Bindung an die in "Überschuß" vorhandenen D^u-Determinanten stattfindet. Sekundär - entsprechend dem Massenwirkungsgesetz - werden die D-Antikörper an die wenigen, aber ca. 90 mal stärkeren D-Antigene gebunden und können somit eine zwar verzögerte, aber wirksame Elimination ermöglichen (Weitzel, 1975).

Diese Ergebnisse unserer Untersuchungen belegen, daß in der klinischen Handhabung auch D^u-Patientinnen der Prophylaxe zu unterziehen sind.

Der Versuch an einem splenektomierten Probanden hat gezeigt, daß die Immunelimination sehr erschwert abläuft, eine Übernahme der Sequestration durch die Leber aber möglich erscheint.

Immunisierungsversuche an splenektomierten Versuchspersonen mit heterologen Erythrozyten schlugen fehl (Rowley, 1950). Unser Versuch deutet darauf hin, daß auch die Wirkung passiv zugeführter D-Antikörper stark abgeschwächt ist, so daß eine Sensibilisierung zustande kam. Diese Beobachtung wird durch einen Bericht von Huchet (1971) bestätigt, der bei einer splenektomierten Frau post partum erst nach wiederholter IgG-anti-D-Injektion eine langsame Elimination fetaler, Rh-positiver Erythrozyten aus der mütterlichen Zirkulation beschrieb. Eine Sensibilisierung

wurde allerdings in diesem Falle bei späteren Kontrollen nicht nachweisbar.

Weitere Untersuchungen von Weitzel (1975) aus Bonn, sowie Anger und Werner (1974) aus Kiel haben dieses erste und vorläufige Ergebnis bestätigt. Alle diese Untersuchungen an splenektomierten Probanden lassen erkennen, daß die Prophylaxe bei splenektomierten Patienten zumindest unsicher wird. Es erscheint deshalb bei einer evtl. Prophylaxe einerseits eine wesentlich höhere Dosierung von Anti-D notwendig und andererseits eine Erfolgskontrolle durch wiederholte Zählung u.U. eingeschwemmter fetaler Erythrozyten obligat.

Zusammenfassung

Mit Hilfe einer von Hughes-Jones und Szur inaugurierten und von Emrich (1971) angegebenen Standardmethode der nuklearmedizinischen Diagnostik wurden Eliminationsstudien an Rh-negativen, freiwilligen Versuchspersonen durchgeführt. Die Methodik wurde für unsere Fragestellung modifiziert eingesetzt. Rh-negative Probanden erhielten ABO-kompatible, Rh-positive, gewaschene, mit ^{51}Cr markierte Erythrozyten injiziert. Die Wirkung von jeweils 300 mcg IgG-anti-D wurde durch Messung der Radioaktivität im peripheren Blut und über den Organen Herz, Leber und Milz verfolgt.

Die Anwendung von IgG-anti-D unter diesen Bedingungen ließ erkennen, daß entsprechend der Elimination der Rh-inkompatiblen Erythrozyten aus dem Blute normalerweise eine Sequestration in der Milz stattfindet. Die intravenöse Anwendung von IgG-anti-D führte jedoch innerhalb von wenigen Stunden zur vollständigen Elimination der injizierten Erythrozyten mit Halbwertszeiten von 0,8 bis 5,3 Stunden. Demgegenüber wurde nach intramuskulärer Injektion der Antikörper eine erhebliche, resorptionsbedingte Verzögerung von minimal 15 Stunden beobachtet, wobei Halbwertszeiten von 20 bis 37 Stunden errechnet wurden.

Eine unterschiedliche Wirkung verschiedenartig hergestellter Präparate war aus dem Verhalten der Eliminationskurven nicht erkennbar. Allerdings war eine statistische Prüfung aufgrund der Versuchszahlen nicht möglich.

Probanden mit der Blutuntergruppe D^u, die sich serologisch ähnlich wie D-positive Personen verhalten, können durch D-positive Erythrozyten dennoch sensibilisiert werden. Eine Prophylaxe mit IgG-anti-D ist nach den hier vorgelegten Ergebnissen möglich. Allerdings sind bei diesen Personen die Eliminationszeiten ebenfalls verzögert mit Halbwertszeiten von 13 und 15 Stunden im Vergleich zu D-negativen Probanden.

IgG-anti-D-Fragmente, sog. $F(ab')_2$-anti-D kann die Plazentarschranke wahrscheinlich nicht passieren und wäre deshalb für eine Anwendung während der Schwangerschaft geeignet. Untersuchungen mit einem derartigen Präparat haben jedoch keine biologische Wirksamkeit erkennen lassen.

Ein Einzelergebnis an einer splenektomierten Versuchsperson wird gesondert besprochen, weil es wesentliche Hinweise auf den möglichen Wirkungsmechanismus der IgG-anti-D-Behandlung liefert.

Literaturverzeichnis

Adner, P. L., S. Foconi, S. Sjölin
Immunization after intravenous injektion of small amounts of Cr^{51}-labelled red cells.
Brit. J. Haemat. 9: 288 (1963)

Adner, P. L., S. Sjölin
Unexpected blood group incompatibility, revealed by ^{51}Cr-labelled red cells.
Scand. J. clin. lab. Invest. 265: 9 (1957)

Anger, H. und H. Werner
Splenektomie und Anti-D-Prophylaxe.
Vortrag 40. Tag. Dtsch. Ges. Gynäk. Geburtsh.
Wiesbaden, 24./28.9.1974

Anger, H. und H. Werner
HbF-Zellclearance bei splenektomierten Rh-negativen Patienten.
Vortrag auf dem Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Bluttransfusion 28.-31. Mai 1974, Berlin

Argall, C. I., J. M. Ball and E. Trentelman
Presence of anti-D antibody in the serum of a D^u patient.
J. lab. clin. Med. 41: 895 (1953)

Bartsch, F. K.
Fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut und
Immunprophylaxe der Rh-Immunisierung.
Acta obstet. gynec. scand. Suppl. 20:3:128 (1972)

Bartsch, F. K., L. A. Sandberg und M. Unander
Vorverlegung der Anti-D-Prophylaxe in die Schwangerschaft.
In: J. Schneider und H. Weitzel
Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung
Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1974

Bläker, F., H. H. Hellwege und K. Mai
Plasma-Elimination intravenös verträglicher menschlicher
Immunglobuline bei Patienten mit humoralen Immundefekten.
Dtsch. med. Wschr. 97: 1151 (1972)

Börner, P.
Die Prophylaxe der Sensibilisierung im Rhesus-System
mit intravenösen Gaben von Immunglobulin G Anti-D.
Indikationen - Klinische Erfahrungen - Experimente zum
Wirkungsmechanismus.
Habilitationsschrift Medizinische Hochschule
Hannover 1969

Börner, P., H. Deicher, H.H. Hoppe, H.U. Pixberg and W.Sieg
Clearance of Rh-positive foetal erythrocytes from the
blood of Rh-negative adults by intravenously applicable
immunoglobulin G anti-D
Vox Sang. 17: 362 (1969)

Börner, P., H. Deicher, H. H. Hoppe, H. Hitschold, S. Holtz und A. Seifert
Klinische Ergebnisse und Untersuchungen zur Anti-D-Dosierung.
Geburtsh. Frauenheilk. 29: 203 (1969)

Brandstaedter, W. und M. Brandstaedter
Morbus haemolyticus neonatorum durch Anti-D bei Faktor D^u der Mutter.
Zbl. Gynäk. 92: 176 (1970)

Bundesärztekammer
Richtlinien mit Informationen zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion.
Bd. 1 (1968) Köln-Berlin

Coombs, R. R. A., M. H. Gleeson-White and J. G. Hall
Factors influencing the agglutinability of red cells. II. The agglutination of bovine red cells previously classified as "inagglutinable" by the building up of an "Antiglobulin: Globulin lattice" on the sensitized cells.
Brit. J. exp. Path. 32: 195 (1951)

Cook, I. A.
Primary Rhesus Immunization of Male Volunteers.
Brit. J. Haematol. 21: 369 (1971)

Crome, P. and P. L. Mollison
Splenic destruction of Rh-sensitized and of heated red cells.
Brit. J. Haemat. 10: 137 (1964)

Cutbush, M. and P. L. Mollison
Relation between characteristics of blood group antibodies in vitro and associated patterns of red cell destruction in vivo.
Brit. J. Haemat. 4: 115 (1958)

Deicher, H., H. H. Hoppe, G. Schellong, J. Schneider und H. Welsch
Vermeidung von Zwischenfällen bei Erythroblastose-Prophylaxe mit Immunglobulin (IgG) Anti-D.
Münch. med. Wschr. 111: 437 (1969)

Deicher, H.
Zum Wirkungsmechanismus der Prophylaxe der Sensibilisierung im Rh-System mit Immunglobulin G Anti-D.
Morbus haemolyticus neonatorum Folge 6
Cilag Chemie

Ebaugh, F. R., Ch. P. Emerson, F. F. Ross
The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival in vivo.
Journal clin. Invest. 31: 1260 (1953)

Emrich, D.
Nuklearmedizin - Funktionsdiagnostik
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971

Finn, R., C. A. Clarke, W. T. A. Donohoe,
R. B. McConnell, P. M. Sheppard, D. Lehane and W. Kulke
Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease.
Brit. med. J. 1: 1486 (1961)

Gibson, T.
The production of high titre (Rh (D) antibody in male volunteers.
Vox. Sang. 24: 425 (1973)

Gray, S. U. and K. Sterling
The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium.
J. clin. Invest. 29: 1604 (1950)

Gunson, H. H., F. Stratton, D. G. Cooper and V. Rawlinson
Primary Immunization of Rh-negative Volunteers.
Brit. med. J. 1: 593 (1970)

Gunson, H. H., F. Stratton and P. K. Philips
The use of modified cells to induce an Anti-Rh-Response.
Brit. J. Haematol. 21: 683 (1971)

Haering, M., and H. V. D. Crabben
Der Abbau Rh-positiver Erythrocyten durch Anti-Rh_o (D)-Seren.
Klin. Wschr. 48: 311 (1970)

Huchet, J., R. Cregut and F. Pinon
Splenectomie and prevention of Rh-sensitisation.
Lancet I: 603 (1971)

Hughes-Jones, N. C. and P. L. Mollison
The Interpretation of Measurements with ^{51}Cr-labelled red cells.
Clin. Sci. 15: 207 (1956)

Hughes-Jones, N. C., P. L. Mollison and N. Veall
Removal of incompatible red cells by the spleen.
Brit. J. Haemat. 3: 125 (1957)

Hughes-Jones, N. C. and L. Szur
Determination of the sites of red-cell destruction using ^{51}Cr-labelled cells.
Brit. J. Haemat. 3: 320 (1957)

Hughes-Jones, N. C.
The estimation of the concentration and equilibrium constant of Anti-D.
Immunology 12: 565 (1967)

Hughes-Jones, N. C., B. Gardner, V. Hunt and I. Norley
Assay of Anti-D Activity by two Radioimmunoassay Techniques Using Purified ^{125} labelled-Anti-D.
Vox Sang. 21: 425 (1971)

Hünermann, B., J. P. Albert and C. Winkler
Prinzipien der szinitgraphischen Leberdiagnostik.
Med. Klin. 40: 1288 (1972)

Jandl, J. H.
Sequestration by the splen of red cells sensitized with incomplete antibody and with metallo-protein complexes.
J. clin. Invest. 34: 912 (1955)

Jandl, J. H. and M. S. Greenberg
The selective destruction of transfused compatible normal red cells in two patients with splenomegaly.
J. Lab. Clin. Med. 49: 233 (1957)

Jandl, J. H. and A. S. Tomlinson
The destruction of red cells by antibodies in man.
J. clin. Invest. 37: 1202 (1958)

Jandl, J. H. and M. E. Kaplan
The destruction of red cells by antibodies in man. III: Quantitative factors influencing the pattern of hemolysis in vivo.
J. clin. Invest. 39: 1145 (1960)

Jouvenceaux, A.
Prevention de l'immunisation anti-Rh
Revue Française d. Transfusion, 1, 1971

Kaplan, K. C., E. A. Catsoulis and E. C. Franklin
Maternal-foetal transfer of human immune globuline
and fragments in rabbits.
Immunology 8: 354 (1965)

Korst, D. R., V. C. Daalas and R. F. Schilling
External scintillation counting over the liver and
spleen after the transfusion of radioactive erythrocytes.
Clin. Res. 13: 195 (1953)

Leidenberger, H.
Abbauort und Elimination Rhesus-positiver radiochromar-
kierter Nabelschnurerythrozyten aus dem Kreislauf
Rhesus-negativer Versuchspersonen.
Ein Beitrag zur Rhesus-Prophylaxe.
Inaug. Diss. Med. Fak. Freiburg 1967

Luboldt, W.
Anti-D-Prophylaxe nach der Geburt von Kindern mit der
Rh-Variante D^u.
Transfus. & Immunhaem. 1: 215 (1973)

Mollison, P. L. and J. C. S. Paterson
Survival after Transfusion of Rh-positiv erythrocytes
previously incubated with Rh antibody.
J. Clin. Path. 2: 109 (1949)

Mollison, P. L. and M. Cutbush
Use of isotope labelled red cells to demonstrate incompatibility in vivo.
Lancet I: 1290 (1955)

Mollison, P. L., M. R. Robinson and D. A. Hunter
Improved method of labelling red cells with radioactive Phosphorus.
Lancet 766 (1958)

Mollison, P. L. and N. C. Hughes-Jones
Sites of removal of incompatible red cells from the circulation.
Vox Sang. 3: 243 (1958)

Mollison, P. L.
The reticulo-endothelial system and red cell destruction.
Proc. roy. Soc. Med. 55: 915 (1962)

Mollison, P. L., P. Crome, N. C. Hughes-Jones and E. Rochna
Rates removal from the circulation of red cells sensitized with different amounts of antibody.
Brit. J. Haemat. 11: 461 (1965)

Mollison, P. L., N. C. Hughes-Jones, M. Lindsay
and J. Wessely
Suppression of primary Rh immunization by passively-
adminstered antibody. Experiments in volunteers.
Vox. Sang. 16: 421 (1969)

Mollison, P. L. and N. Veall
The use of the Isotope ^{51}Cr as a label for red cells.
Brit. J. Haemat.

Mollison, P. L., M. Frame ans M. E. Ross
Differences between Rh (D) negative subjects in
response to Rh (D) antigen.
Brit. J. Haemat. 19: 257 (1970)

Mueller-Eckhardt, Ch.
Blutgruppenserologie
Laboratoriumsblätter für Medizinische Diagnostik
XII: 3 (1971), Behringswerke AG

Prokop, O. und G. Uhlenbruck
Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen
2. Auflage 1966
VEB Georg Thieme, Leipzig

Read, R.
Studies of red-cell volume and turnover using
Radiochromium.
New Engl. J. med. 24: 1021 (1954)

Read, R. C., G. W. Wilson and F. H. Gardner
The use of radioactive sodium chromate to evaluate the life span of the red blood cell in health and certain hematologic disorders.
Amer. of the Med. Sci. 40: 228 (1954)

Rowley, D. A.
The Formation of Circulating Antibody in the Splenectomized Human Being Following Intravenous Injection of Heterologous Erythrocytes.
J. Immunology 65 , 515, 1950

Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden.
3. Auflage. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1971

Schneider, J., H. Leidenberger und H. Heimpel
Zur Pathophysiologie der Rh- Prophylaxe.
Elimination rhesuspositiver radiochromierter Nabelschnurerythrozyten bei rhesusnegativen Versuchspersonen nach Applikation von Anti-D.
Med. Klin. 65: 718 (1970)

Schneider, J., S. J. Brinkmann, H. J. Jesdinsky,
G. Schellong und H. Welsch
Zur Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung mit Anti-D.
Gemeinschaftsstudie 1965-1970
DFG-Forschungsbericht 1973

Shih, S. C., W. N. Tauxe, V. F. Fairbanks and
H. F. Taswell
Urinary excretion of Cr from labelled erythrocythes
J. amer. med. Ass. 220: 814 (1972)

Sieg, W., P. Börner, H. U. Pixberg und H. Deicher
Die Elimination Rh-positiver fetaler Erythrozyten aus
der Blutbahn Rh-negativer Frauen durch körpereigene
Isoagglutinine.
Blut 21: 69 (1970)

Sinclair, N. R. St. C., R. K. Lees, P. L. Chan and
R. H. Khan
Regulation of the immune response
II. Further studies on differences in ability of $F(ab')_2$
and 7S Antibodies to inhibit an antibody response.
Immunology 19: 105 (1970)

Steenken, Ch., P. Börner, P. Mariß, K. Heide, V. Marks
und H. Deicher
Elimination Rhesus-(D)-inkompatibler Erythrozyten durch
$F(ab')_2$ G-anti-D
im Druck

Sterling, K., S. J. Gray
Determination of the circulating red cell volume in
man by radioactive Chromium.
J. clin. Invest. 29: 1614 (1950)

Ster, K., H. S. Goodman, M. Berger
Experimental isoimmunization to haemoantigens in man.
J. Immunol. 87: 189 (1961)

Stephan, W.
Hepatitis-free and stable human serum for intravenous therapy.
Vox Sang. 20: 442 (1971)

Stewart, J. W. and P. L. Mollison
Rapid destruction of apparently compatible red cells.
Brit. Med. J. S: 1274 (1959)

Weitzel, H.
Der Wandel des Rhesus-Problems. Wirkung und Nebenwirkung der Prophylaxe mit Immunglobulin-G-anti-D.
Habilitationsschrift, Bonn, 1975

Woodrow, J. C., R. Finn and J. R. Krevans
Rapid clearance of Rh positive blood during experimental Rh immunisation.
Vox Sang. 17: 349 (1969)

LEBENSLAUF

Am 28. Juli 1949 wurde ich als Tochter des Bergingenieurs Peter Dennhardt und seiner Ehefrau Franziska, geb. Jüsgens, in Jülich geboren.
Von 1956 - 1960 besuchte ich die Volksschule in Siersdorf, Kreis Jülich, ab 1960 das Neusprachliche Mädchengymnasium in Jülich, wo ich im Mai 1968 das Abitur bestand.
Im WS 1968/69 begann ich das Medizinstudium an der Universität Bonn. Im SS 1969 legte ich das Vorphysikum und im WS 1970/72 das Physikum ab.
Am 12.7.74 beendete ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Bonn.
Am 1. Oktober 1974 begann ich meine Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Universitätsklinik Bonn.
Am 20.12.74 heiratete ich den Diplom-Ingenieur Dr. Stepan Kasik.
Den chirurgischen Abschnitt der Medizinalassistentenzeit begann ich zum 1.2.75 am Krankenhaus Waldshut/Hochrhein und wechselte zum 1.7.75 auf die gynäkologische Abteilung des Krankenhauses.

Fotodruck: Mainz, Aachen, Malteserstraße 9, am Ponttor, Telefon (02 41) 2 73 05
Betrieb: Neupforte 13, Nähe Markt